

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年1月29日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009626 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/47, C12N 15/12,
5/10, 5/10, C07K 16/18, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009180

(22) 国際出願日: 2003年7月18日 (18.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-211951 2002年7月22日 (22.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 針谷 正祥 (HARIGAI, Masayoshi) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都中野区上鷺宮二丁目4番13号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 竹内 雅博 (TAKEUCHI, Masahiro) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 山地 昇 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21山之

内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 赤松 政彦 (AKA-MATSU, Masahiko) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 角山 和久 (TSUNOYAMA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENE ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチ関連新規遺伝子

(57) Abstract: Novel polypeptide whose incidence rate is higher in the synovial tissue of human rheumatoid arthritis (RA) patients than in the synovial tissue of human osteoarthritis (OA) patients; a polynucleotide coding for the polypeptide; a vector comprising the polynucleotide; a transformant cell comprising the vector; and an antibody to the polypeptide. Further, there are disclosed a polynucleotide having at least 15 bases which specifically hybridizes with the polynucleotide; a testing method useful for diagnosis of RA; and a testing kit useful for diagnosis of RA.

(57) 要約: ヒト変形性関節症 (OA) 患者滑膜組織に比較して、ヒト慢性関節リウマチ (RA) 患者滑膜組織において発現量が亢進している新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞、及び前記ポリペプチドに対する抗体を開示する。更に、前記ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド、RA診断に有用な検査方法、及びRA診断に有用な検査用キットを開示する。

WO 2004/009626 A1

明 細 書

慢性関節リウマチ関連新規遺伝子

技術分野

本発明は、慢性関節リウマチ（RA）に関連する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞及びRA診断に有用な検査方法に関する。

背景技術

RA は滑膜組織に病変の主座を持ち、関節の発赤、腫脹、熱感、疼痛、運動制限、および破壊をもたらす原因不明の慢性炎症性疾患である。RA の滑膜組織では、インターロイキン-1（interleukin-1、IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-18（IL-18）、腫瘍壊死因子 α （tumor necrosis factor- α 、TNF- α ）などの炎症性サイトカイン、一酸化窒素（nitric oxide、NO）、プロスタグランジン（prostaglandins、PGs）などの過剰産生が知られている（非特許文献1参照）。また、滑膜組織を構成する免疫担当細胞はCD40/CD40 リガンド系、ICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）/ LFA-1（leukocyte adhesion molecule-1）系などの細胞表面分子を介して相互に活性化しあい、炎症反応の遷延に関与すると考えられている（非特許文献2参照）。近年、モノクローナル抗体、可溶性受容体などを用い、IL-1、IL-6 や TNF- α を標的とした治療法が開発されその有効性が注目を集めている（非特許文献3参照）。しかし、従来の治療標的分子を機序とする治療法では完全寛解導入には至らない患者群が存在する（非特許文献4参照）。従って、既存の報告とは異なる新しい治療標的分子の同定が望まれている。

また、RA 病態解析が進むにつれて、滑膜の炎症、免疫異常を標的に、滑膜過増殖を抑制し、関節の骨破壊を抑制、あるいは遅延する療法の挑戦とともに、RA の早期診断、早期治療の意義が注目されている。一方、米国の大学から RA の分

類に関する基準が定義されているが（非特許文献 5 参照）、これらの基準は単なるランドマークであり、その病状パターンが多様であるため、RA の診断、特に定量的かつ簡便な診断は困難であるとされてきた。従って、定量的かつ簡便な RA の診断方法が待望されている。

本発明のポリペプチドの一つである RA2 の配列に関連する配列が、データベース genpept に AK094461（2002. 7. 15）として収載され、特許文献 1、特許文献 2、及び特許文献 3 に記載されている。特許文献 1 には、当該ポリペプチドのアンタゴニストは炎症反応を緩和するために処理することができ、例えば、動脈硬化の心臓病、炎症性腸疾病、クローン病、慢性関節リウマチおよび膵臓炎を治療するために処置することができるとの記載がある。特許文献 2 には、RA2 と相同性のある配列を含む多数の蛋白質が記載され、癌、消化剤障害、免疫障害、内分泌腺疾患（例えば糖尿病）、神経疾患（例えばアルツハイマー病、パーキンソン、クロイツフェルトヤコブ病、脳脊髄炎、脳膜炎、精神分裂病）および結合性疾患（例えば骨粗鬆症、関節炎）等の治療に有用であることが記載されている。特許文献 3 には、RA2 遺伝子配列に相同性のある配列を含む多数の遺伝子が挙げられ、各々は組織発現分布に基づき、増殖性疾患、癌、腫瘍、造血性疾患、免疫系の疾病、AIDS、自己免疫疾患（例えば慢性関節リウマチ）、炎症、アレルギー、神経性疾患（例えばアルツハイマー病）、認識障害、精神分裂病、喘息、皮膚病（例えば乾癬）、敗血症、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、心血管障害、腎臓障害、胃腸病、妊娠に関連する障害、内分泌腺障害および伝染病等の処置に有用であると述べられている。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP1L 及び DGPP1S の配列と相同性のある配列が、データベース genpept に BC033025（2002. 6. 24）として収載されている。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP2L と相同性のある配列が、特許文献 4、特許文献 5、及び特許文献 6 に記載されている。このうち特許文献 4 要約中には、DGPP2L と相同性のある配列は悪性腫瘍、血液疾患、HIV 感染、免疫性疾患および種々の炎症の診断、処置に有用と記載されている。特許文献 5 には DGPP2L と相同性のある配列は過増殖性疾患のような腫瘍性疾患を含む疾患の診断、治療、予防／予後に有用であること、神経性疾患、免疫系疾患、筋疾患、生殖性疾患、

消化関係の疾患、肺疾患、循環器疾患、又は腎疾患のような疾患の治療にも有用であること、また、当該ポリペプチドの異常な発現や活性と関わる疾患の検査薬として有用であり、癌や慢性関節リウマチの処置に有用であることが記載されている。特許文献 6 には DGPP2L と相同性の高い配列が開示され、過増殖性疾患（例えば癌）、免疫不全性疾患（例えば AIDS）、自己免疫疾患（例えば関節炎）、神経性疾患（例えばアルツハイマー病）、代謝異常（例えばフェニルケトン尿症）、炎症性疾患（例えば喘息）、循環器病（例えばアテローム性動脈硬化症）、血液疾患（血友病）、生殖性疾患（例えば不妊症）及び感染症（例えばインフルエンザ）等の検査、処置、予防または予後に有用であると記載されている。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP2S と同一の配列が前記特許文献 4 に記載され、相同性のある配列が前記特許文献 5 及び特許文献 6 に記載されている。

【特許文献 1】

国際公開第 00/42070 号パンフレット

【特許文献 2】

国際公開第 01/77137 号パンフレット

【特許文献 3】

国際公開第 01/32910 号パンフレット

【特許文献 4】

国際公開第 02/26798 号パンフレット

【特許文献 5】

国際公開第 01/55163 号パンフレット

【特許文献 6】

国際公開第 01/55301 号パンフレット

【非特許文献 1】

「ザ・ジャーナル・オブ・エクスメンタル・メディシン（The Journal of Experimental Medicine）」、(米国)、1991年、第173巻、p. 569-574

【非特許文献 2】

「ザ・ジャーナル・オブ・リユーマトロジー（The Journal of

Rheumatology)」、(カナダ)、2002年、第29巻、p. 875-882

【非特許文献3】

「カレント・ファーマシューティカル・バイオテクノロジー (Current Pharmaceutical Biotechnology)」、(米国)、2000年、第1巻、p. 217-233

【非特許文献4】

「ネイチャー・レビューズ・イムノロジー (Nature Reviews Immunology)」、(英国)、2002年、第2巻、p. 364-371

【非特許文献5】

ジェー・アックスフォード (J. Axford) 編、「メディシン (Medicine)」, (米国)、ブラックウエルサイエンス (Blackwell Science)、1996年、p3. 18-3. 22

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脾臓由来 cDNA を鋳型として6つの遺伝子全長配列を取得することに成功した(実施例1)。このうち、5つは新規な遺伝子であった。また、前記6つの遺伝子がコードする蛋白質を動物細胞株で発現することに成功した(実施例2)。更に、前記6つの遺伝子は、ヒトRA患者滑膜組織において発現量が亢進していることを見出した。加えて、RAの病理所見スコアに連動して前記各遺伝子の発現量が亢進していること、すなわちRAの炎症症状の重篤性と前記各遺伝子の発現量の亢進が相関することを見出した(実施例4)。これらの知見から、RAの進行度を検出することができるRA診断法として有用な検査方法を可能にした。

これらの結果、新規遺伝子、前記遺伝子がコードする蛋白質、前記遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された細胞及び抗体、並びにRAの診断に有用な検査方法及び該検査用キットを提供し本発明を完成した。

すなわち本発明は、

[1] (1) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、

[2] 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

[3] [1] または、[2] に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

[4] [3] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

[5] [4] に記載の発現ベクターで形質転換された細胞、

[6] 配列番号4で表されるアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体、

[7] 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9で表されるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド、

[8] (1) 被験者の滑膜生検サンプルにおける、i) [3] に記載の塩基配列あるいはii) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び(2) 健常者または非慢性関節リウマチ患者の滑膜生検サンプルにおける前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法、

[9] (1) [3] に記載のポリヌクレオチド、あるいは (2) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列において、1~10 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号 12 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで表される遺伝子の特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む慢性関節リウマチ検査用キット

に関する。

本発明のポリペプチドの一つである RA2 と同一の配列は知られていないが、相同性のある配列がデータベース genpept に AK094461 (2002. 7. 15) として収載され、特許文献 1、特許文献 2、及び特許文献 3 に記載されている。特許文献 1、特許文献 2、及び特許文献 3 には、当該ポリペプチド等が関与するとして多数の疾患を列挙しておりその中に慢性関節リウマチや関節炎が含まれている。しかしながら、特許文献 1 は当該分子がリンパ節、脾臓、胸腺、精巣、小腸、ヒト大動脈内皮細胞、平滑筋、腎臓、マスト細胞、好酸球、扁桃腺、脾臓、大腸、末梢血リンパ細胞、胃、気管、CD4⁺ 及び CD8⁺ を含む T 細胞および骨髄などで発現することのみから当該分子がサイトカインであって、当該分子のアンタゴニストは RA を含む炎症性疾患に有用であると記載している。特許文献 2 には当該分子に関する実施例は全く記載されていない。特許文献 3 には複数の分子が記載され実施例の記載を見ると現在形で記載されているにすぎない。しかも、特許文献 1~3 には、当該分子の滑膜での発現の有無や RA 患者での発現量については全く記載されていない。従って RA2 が RA の診断に有用であることは本発明者らが初めて見出した知見であり、更には、この知見を利用した RA の検査方法は本発明者らによって初めてなされた発明である。

本発明のポリペプチドの一つである RA3 と同一又は相同性の高い配列は知られていない。従って、RA3 は本発明者らが初めて見出し、取得したポリペプチドであり、RA3 の発現量が RA の炎症症状の重篤性と相関して亢進することは本発明者

らが初めて見出した知見である。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP1L 及び DGPP1S と同一の配列は知られていない。これらと相同性のある配列が、データベース genpept に BC033025 (2002. 6. 24) として収載されているがその機能については不明である。しかも、DGPP1L 及び DGPP1S が RA の検査に有用であることは本発明者らが初めて見出した知見である。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP2L と同一の配列は知られていないが、相同性のある配列が特許文献 4、特許文献 5、及び特許文献 6 に記載されている。このうち特許文献 4 の要約中には、DGPP2L と相同性のある配列は悪性腫瘍、血液疾患、HIV 感染、免疫性疾患および種々の炎症の診断、処置に有用であると記載されている。特許文献 5 には DGPP2L と相同性のある配列を含む多数の配列が開示され、これらのポリペプチドは過増殖性疾患のような腫瘍性疾患を含む疾患の診断、治療、予防／予後に有用であること、神経性疾患、免疫系疾患、筋疾患、生殖性疾患、消化関係の疾患、肺疾患、循環器疾患、又は腎疾患のような疾患の治療にも有用であること、当該ポリペプチドの異常な発現や活性と関わる疾患の検査薬として有用であり、癌や慢性関節リウマチの処置に有用であることが記載されている。しかしながら、これら多数の配列のうち、どの配列のものがどの用途に用いることができるかの具体的開示はなく、また、実際に行った実施例もない。

特許文献 6 には DGPP2L と相同性のある配列を含む多数の配列が開示され、過増殖性疾患（例えば癌）、免疫不全性疾患（例えば AIDS）、自己免疫疾患（例えば関節炎）、神経性疾患（例えばアルツハイマー病）、代謝異常（例えばフェニルケトン尿症）、炎症性疾患（例えば喘息）、循環器病（例えばアテローム性動脈硬化症）、血液疾患（血友病）、生殖性疾患（例えば不妊症）及び感染症（例えばインフルエンザ）等の検査、処置、予防または予後に有用であると記載されている。しかしながら、特許文献 6 には具体的な実施例の記載はおろか、これらの用途の具体的な裏付けは全くない。更に特許文献 5 及び特許文献 6 には DGPP2L 類似分子の滑膜での発現の有無や RA 患者での発現量については全く記載されていない。従って DGPP2L が RA の診断に有用であることは本発明者らが初めて見出

した知見であり、更には、この知見を利用した RA の検査方法は本発明者らが初めて行った発明である。

本発明のポリペプチドの一つである DGPP2S と同一の配列が前記特許文献 4 に記載され、相同性のある配列が前記特許文献 5 及び特許文献 6 に記載されている。上述したように特許文献 5 及び特許文献 6 には滑膜での発現の有無や RA 患者での発現量については全く記載されていない。従って DGPP2S が RA の診断に有用であることは本発明者らが初めて見出した知見であり、更には、この知見を利用した RA の検査方法は本発明者らが初めて行った発明である。

図面の簡単な説明

図1は、各新規蛋白質の発現を示した図である。

図 2 は、RA 滑膜線維芽様細胞、OA 線維芽様細胞における各遺伝子の発現量を比較した図である。図の縦軸は相対的発現度を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明について詳細に説明する。

本発明のポリペプチドには、

(1) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(2) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA 患者特異的に発現が増強するポリペプチド、あるいは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA 患者特異的に発現が増強するポリペプチド；（以下、機能的等価改変体と称する）；及び

(3) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10
配列番号12で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配
列を有し、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド（以下、相同ポ
リペプチドと称する）；
が含まれる。

「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2、配列番号4、配列番号
6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、
RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド」、あるいは、「配列番号2、配列
番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列
において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ
酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特
異的に発現が増強するポリペプチド」が含まれる。

「本発明の相同ポリペプチド」は、「配列番号2、配列番号4、配列番号6、配
列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上
であるアミノ酸配列からなり、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペ
プチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは9
5%以上、更に好ましくは98%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチド
が好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLASTパッケージ[sgi32bit版, バ
ージョン2.0.12; National Center for Biotechnology Information (NCBI) より入手]
のbl2seqプログラム (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS
Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用いて得られた値Identitiesを意味する。
なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、

「Gap挿入Cost値」を「0」で、

「Gap伸長Cost値」を「0」で、

「Matrix」として「BLOSUM62」を、

それぞれ使用する。

「RA患者特異的に発現が増強する」とは、非RA患者に比してRA患者の滑膜組織

または滑膜線維芽様細胞において発現が2倍以上増強することを意味する。

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸からなるポリペプチド、本発明の機能的等価改変体、及び本発明の相同ポリペプチドを総称して、以下、「本発明のポリペプチド」と称する。更に、「本発明のポリペプチド」、及び、配列番号12で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを総称して以下「本発明の検査方法用ポリペプチド」と称する。「本発明の検査方法用ポリペプチド」のうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「RA2蛋白質」、配列番号4で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「RA3蛋白質」、配列番号6で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「DGPP1L蛋白質」、配列番号8で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「DGPP1S蛋白質」、配列番号10で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「DGPP2L蛋白質」、配列番号12で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「DGPP2S蛋白質」と称する。

本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」、「配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド、あるいは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド」あるいは、「配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上（好ましくは95%以上、更に好ま

しくは98%以上)であるアミノ酸配列からなり、しかも、RA患者特異的に発現が増強するポリペプチド」が好ましく、「配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」がより好ましい。

また、本発明の RA2 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号2記載のアミノ酸配列で示される RA2 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1記載の塩基配列である。

本発明の RA3 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号4記載のアミノ酸配列で示される RA3 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号3記載の塩基配列である。

本発明の DGPP1L 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号6記載のアミノ酸配列で示される DGPP1L 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号6記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号5記載の塩基配列である。

本発明の DGPP1S 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号8記載のアミノ酸配列で示される DGPP1S 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号8記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号7記載の塩基配列である。

本発明の DGPP2L 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号10記載のアミノ酸配列で示される DGPP2L 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号10記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリ

ヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号 9 記載の塩基配列である。

本発明検査方法用の DGPP2S 蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列で示される DGPP2S 蛋白質、その機能的等価改変体、又は、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号 1 1 記載の塩基配列である。

本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチドを含む）、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、（１）PCR を用いた方法、（２）常法の遺伝子工学的手法（すなわち cDNA ライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は（３）化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、W001/34785 に記載されていると同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明の検査方法用ポリペプチド（すなわち、RA2 蛋白質、RA3 蛋白質、DGPP1L 蛋白質、DGPP1S 蛋白質、DGPP2L 蛋白質または DGPP2S 蛋白質）、「本発明の遺伝子」を本発明の検査用ポリペプチドをコードする遺伝子（すなわち、RA2 遺伝子、RA3 遺伝子、DGPP1L 遺伝子、DGPP1S 遺伝子、DGPP2L 遺伝子または DGPP2S 遺伝子）と読み替える。以下、本発明のポリヌクレオチドを例に記載するが、本発明のポリヌクレオチドに含まれない本発明の検査方法用ポリペプチド（より具体的には、配列番号 1 2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者特異的に発現が増強するポリペプチド、配列番号 1 2 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個、好ましくは 1～7 個、更に好ましくは 1～5 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者特異的に発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号 1 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドも同様にして製造することができる。

PCR を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 a) 第 1 製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば、ヒト RA 患者由来滑膜から mRNA を抽出する。次いで、この mRNA をランダムプライマーまたはオリゴ dT プライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖 cDNA を合成することが出来る。得られた第一鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば実施例 1 に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 b) 第 2 製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 c) 第 3 製造法、d) 第 4 製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。より具体的には、化学合成法によって製造したヌクレオチド断片を結合することによっても製造できる。また、各ポリヌクレオチド (オリゴヌクレオチド) は、DNA 合成機 (例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社) など) を用いて合成することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクター DNA に再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベ

クターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施例 1 及び実施例 2 に記載のように本発明のポリヌクレオチドをほ乳類動物細胞用の発現ベクター pcDNA3.1 に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターを市販のトランスフェクション試薬リポフェクトアミンを用いてヒト胎児腎臓由来 293T 細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により本発明の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 293T 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞に生産される本発明の蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。

本発明の蛋白質はマーカ配列とインフレームで融合して発現させることで、該蛋白質の発現の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカ配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクター Xa、トロンピンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入すること

により、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

本発明のポリヌクレオチドは、それ自体、またはその一部を後述の RA の検査方法においてハイブリダイズプローブとして用いることができ、RA の検査に有用である。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体の作製や、発現レベルを検出・定量する際のコントロールとして用いることができる。

＜本発明の抗体の製造方法＞

本発明の抗体の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」＜本発明のポリペプチドに結合する抗体＞に記載されていると同様に実施できる。本発明の抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者特異的に発現が増強するポリペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者特異的に発現が増強するポリペプチド、あるいは配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全部または断片を直接投与することで得ることができる。また、前記ポリペプチドをコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は前記ポリペプチドまたはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイド

ロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

＜本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド＞

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、または配列番号 9、で表されるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基を有するポリヌクレオチドも本発明に含まれる。本発明のポリヌクレオチドと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズし、他のポリヌクレオチドとはハイブリダイズしないことを意味する。厳格な条件とは、ハイブリダイゼーションのための条件として、「5xSSPE、5 x Denhard' s 液、0.5% SDS、40% ホルムアミド、200 μ g/ml 鮭精子 DNA、37°C オーバーナイト」程度の条件であり、より厳しい条件としては「5xSSPE、5 x Denhard' s 液、0.5% SDS、50% ホルムアミド、200 μ g/ml 鮭精子 DNA、42°C オーバーナイト」程度の条件である。また洗浄のための条件として、緩い条件としては「5xSSC、1% SDS、42°C」、通常「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようなポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは 15bp~40bp の鎖長を有する。プライマーとして好ましい塩基配列は、1) 配列番号 25 及び配列番号 26 に記載の塩基配列で表されるプライマー、2) 配列番号 27 及び配列番号 28 に記載の塩基配列で表されるプライマー、3) 配列番号 29 及び配列番号 30 に記載の塩基配列で表されるプライマー、4) 配列番号 31 及び配列番号 32 に記載の塩基配列で表されるプライマーが挙げられる。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一

部若しくは全部の配列（またはその相補配列）を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

本発明に基づくプローブやプライマーは、RA 診断の検査のための本発明の遺伝子発現量の測定に利用することができる。

本発明に基づいて、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技法は公知で、遺伝子発現を解析するために用いられている (Chee, M. et al. (1996) Science, . 274, 610-613)。

<RA の検査方法／RA 検査用キット>

ヒト変形性関節症 (OA) 患者滑膜組織に比較して、ヒト RA 患者滑膜組織において発現量が亢進している遺伝子を見出したことから、これらの発現量を利用して RA 疾患を検出することが出来る。RA 特異的な現象を捉えるために、滑膜組織に病変を有する OA を対照とした。具体的には、次の工程を含む態様が例示される。すなわち、

(1) 被験者の滑膜生検サンプルにおける、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び (2) 健常者または非RA患者の滑膜生検サンプルにおける前記遺伝子の発現レベルと比較する工程、である。

本発明のRAの検査方法における遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。従って、本発明によるRAの検査方法は、本発明の遺伝子に対応するmRNAの発現レベル、または、該遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

工程 (1) における本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する方法は公知の遺伝子解析法に従って実施することが出来る。例えば、本発明の遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することが出来る。具体的には、被験者が

ら得た滑膜細胞由来の核酸、例えばmRNA等を用いて測定することが出来る。mRNA量の測定は、本発明の遺伝子配列を特異的に増幅できるように設計したプライマーを用いて遺伝子増幅反応方法にて測定できる。遺伝子増幅反応方法としては、特に限定されないが、PCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法などを利用することが出来る。本発明のRAの検査方法に用いられるプライマー、または、RA検査用キットに含まれるプライマーは、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードする遺伝子配列を特異的に増幅できるものであれば、特に限定されず、本発明の遺伝子の塩基配列に基づいて設計できる。PCR増幅モニター法におけるプライマー設計は、プライマー設計ソフトウェアPrimer Express (PE Biosystems)などを利用してできる。また、上記本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドをプライマーとして使用できる。

ハイブリダイゼーション技術を利用したRAの検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロット法、DNAマイクロアレイ法などを使用して行うことが出来る。さらには、RT-PCR等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター（リアルタイムPCR）法（Genome Res., 6(10), 986, 1996）を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。PCR増幅モニター法としては、例えば、ABI PRISM7900（PEバイオシステムズ社）を用いることが出来る。リアルタイムPCRは公知の方法であり、そのための装置およびキットは市販されており、これらを利用して簡便に行える。より具体的には、実施例4に記載の方法により実施できる。

また、工程（1）において、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する方法として、発現レベルを前記遺伝子により発現される蛋白質の検出によって測定する方法が可能である。このような検査方法としては、例えば、被験者から得た滑膜細胞由来の細胞抽出液を用いて、前記蛋白質に結合する抗体、好ましくは、前記蛋白質に特異的に結合する抗体を利用したウエスタンブロッティング、免疫沈降法、ELISA法などを利用することが出来る。

工程（２）においては、工程（１）で得られた発現レベルと健常者または非RA患者における発現レベルと比較するのであれば、比較方法は特に限定されず、例えば実施例４に記載の方法で比較できる。

本発明の RA 検査用キットには、少なくとも、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーが含まれる。

順方向及び逆方向プライマー対の例としては、本発明の検査方法用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。本発明のRA検査用キットに含めることが出来る他の試薬としては、PCRを行うのに必要な試薬（例えば、Taqポリメラーゼ、ヌクレオチド基質、緩衝液など）などを挙げることができる。

実施例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Sambrook, J. et al, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989等) の遺伝子操作実験マニュアルや試薬等に添付の指示書に従った。

（実施例１）全長オープンリーディングフレーム（open reading frame、ORF）のクローニングと蛋白質発現プラスミドの構築

表１に示すプライマーセット（配列番号１３－配列番号１４、配列番号１５－配列番号１６、配列番号１７－配列番号１８、配列番号１９－配列番号１８、配列番号２０－配列番号２１、又は、配列番号２２－配列番号２１）、ヒト脾臓由来 cDNA (Human spleen 5' -stretch plus cDNA ; インビトロジェン社)、及び DNA ポリメラーゼ (*Pyrobest* (商標) DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、94℃2 分の後、98℃10 秒、60℃30 秒、72℃1 分 30 秒のサイクルを 20 回、続いて 72℃3 分の PCR 反応を行った。この PCR 産物をフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿処理し、精製水に溶解した。これらの DNA のうち、プライマーセ

ット配列番号 13—配列番号 14 で増幅した DNA を BamHI-XhoI で二重切断し、その他の DNA を HindIII-XhoI で二重切断した。発現ベクター pcDNA3.1-CFL の BamHI-XhoI 又は HindIII-XhoI 部位に挿入し、各発現プラスミドを CFL-RA2、CFL-RA3、CFL-DGPP1L、CFL-DGPP1S、CFL-DGPP2L、CFL-DGPP2S と名付けた。pcDNA3.1-CFL は、pcDNA3.1(+) (インビトロジェン社) の XhoI-XbaI 部位に配列番号 23 及び配列番号 24 からなる 2 重鎖オリゴ DNA を挿入したプラスミドであり、本プラスミドにより、目的蛋白質に FLAG タグが付加されて発現される。前記各プラスミドの配列をジデオキシターミネーター法により、ABI3700 DNA シークエンサー (アプライドバイオシステムズ社) を用いて解読したところ、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、又は配列番号 11 で表される配列が得られた。それぞれの全長 ORF 配列を決定した。該遺伝子をそれぞれ RA2、RA3、DGPP1L、DGPP1S、DGPP2L、及び DGPP2S と名付けた。推定アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及び配列番号 12 に示した。配列番号 2 で表される RA2 の ORF は 357 アミノ酸からなる新規蛋白質を、配列番号 4 で表される RA3 の ORF は 101 アミノ酸からなる新規蛋白質を、配列番号 6 で表される DGPP1L の ORF は 313 アミノ酸からなる新規蛋白質を、配列番号 8 で表される DGPP1S の ORF は 264 アミノ酸からなる新規蛋白質を、配列番号 10 で表される DGPP2L の ORF は 291 アミノ酸からなる新規蛋白質を、そして配列番号 12 で表される DGPP2S の ORF (は 271 アミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

【表 1】

	フォワードプライマー (5' 末端に制限酵素 BamHI あるいは HindIII 認識配列 が付加された配列)	リバースプライマー (5' 末端に制限酵素 XhoI 認識配列が付加された配 列)
CFL-RA2	配列番号 13	配列番号 14
CFL-RA3	配列番号 15	配列番号 16
CFL-DGPP1L	配列番号 17	配列番号 18
CFL-DGPP1S	配列番号 19	配列番号 18

CFL-DGPP2L	配列番号 2 0	配列番号 2 1
CFL-DGPP2S	配列番号 2 2	配列番号 2
FLAG	配列番号 2 3	配列番号 2 4

(実施例 2) 動物細胞株での発現

実施例 1 において作製した 6 個の発現プラスミドを、トランスフェクション試薬（リポフェクトアミン；ギブコ社）を用いて、添付指示書に従い 293T 細胞（インビトロジェン社）にそれぞれ導入した。プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 48-60 時間培養を継続し、細胞を回収した。回収した細胞に 50mM Tris pH7.5, 0.25M NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF（シグマ社）から成る溶液を加えて溶解し、エッペンドルフチューブ遠心機（トミー精工社）にて 15000 回転 15 分遠心後の上清を回収した。この導入細胞ライゼート中に目的蛋白が存在することを C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体（マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 M2；シグマ社）を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記ライゼートを SDS/4%~20% アクリルアミドゲル（第一化学薬品社）に電気泳動（還元条件）後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜（ミリポア社）に転写した。転写後の PVDF 膜にブロックエース（大日本製薬社）を添加してブロッキングした後、ビオチン化マウス抗 FLAG モノクローナル抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（アマシャムファルマシア社）を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社）を用いて目的蛋白の発現を確認した。RA2、DGPP1L、DGPP1S、GDPP2L、DGPP2S の各発現プラスミドを導入した細胞のライゼートにおいて、各予想分子量（RA2:40.1kDa、DGPP1L:34.3kDa、DGPP1S:29.5kDa、DGPP2L:32.3kDa、DGPP2S:30.4kDa）付近に位置するバンドが検出され、各導入細胞で目的蛋白質が発現していることがわかった（図 1）。RA3 はプロリン残基の含有率が高いため、電気泳動上の移動度が低く予想分子量（11.0kDa）よりも大きな分子量で観察された（図 1）。

(実施例 3) 滑膜組織サンプル、滑膜線維芽様細胞サンプルの取得

ヒトRA患者、ヒトOA患者から滑膜生検により滑膜組織、滑膜線維芽様細胞を得た。滑膜組織の調製はHarigai Mらの文献 (J Rheumatol. 1999 May;26(5):1035-43) に、滑膜線維芽様細胞の調製はZhang HGらの文献 (Arthritis Rheum. 2000 May;43(5):1094-105) に従った。G1、G6はヒトRA患者各2名の滑膜組織を混合したサンプルであり、各種病理所見スコアは、表層細胞重層化についてはG1:1.5、G6:0、リンパ濾胞形成についてはG1:2.5、G6:0、血管新生についてはG1:2.0、G6:0.5であった。G7はヒトOA患者2名の滑膜組織を混合したサンプルである。病理所見スコアはHarigai Mら, Clin Immunol Immunopathol. 1993 Oct;69(1):83-91. に基づくものであり、滑膜組織の炎症の程度を反映している。病理所見スコアが高いG1は炎症の程度がG6よりも大きいサンプルである。

RS1、RS2 はヒト RA 患者各 1 名の滑膜線維芽様細胞サンプルであり、各種病理所見スコアは、表層細胞重層化については RS1:2、RS2:0、リンパ濾胞形成については RS1:2、RS2:0、血管新生については RS1:3、RS2:2 であった。すなわち RS1 と RS2 の比較において、RS1 は RS2 よりも炎症の程度が大きいサンプルである。OA1、OA2 はヒト OA 患者各 1 名の滑膜線維芽様細胞サンプルである。

(実施例 4) 滑膜組織、滑膜線維芽様細胞における各遺伝子の発現上昇

ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (PE バイオシステムズ社) (以降 Prism7900 とする) によるリアルタイム PCR を PCR 検出定量試薬キット SYBR Green PCR Master Mix (PE バイオシステムズ社) を用いてキット添付の指示書に従って行い、滑膜組織、滑膜線維芽様細胞における各遺伝子の発現量を定量的に測定した。以下に詳細を述べる。ABI7900 による測定に用いたプライマーは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、または配列番号 11 に表した配列情報から Primer Express (PE バイオシステムズ社) により設計した。各遺伝子のプライマーは表 2 に示した。

【表 2】

	フォワードプライマー	リバースプライマー
RA2	配列番号 2 5	配列番号 2 6

RA3	配列番号 2 7	配列番号 2 8
DGPP1L, DGPP1S	配列番号 2 9	配列番号 3 0
DGPP2L, DGPP2S	配列番号 3 1	配列番号 3 2
G3PDH	配列番号 3 3	配列番号 3 4

RA 滑膜組織 (G1 及び G6 サンプル)、OA 滑膜組織 (G7 サンプル)、RA 滑膜線維芽様細胞 (RS1 及び RS2 サンプル) および OA 滑膜線維芽様細胞 (OA1 及び OA2 サンプル) から RNA 抽出用試薬 ISOGEN(ニッポンジーン社)を用いて全 RNA (total RNA) 抽出を行った。抽出は、試薬添付のプロトコールに従った。抽出方法の詳細を以下に記載する。100mg の凍結組織に対し、1ml の ISOGEN を加え、ホモジナイズ後、5 分静置した。0.2ml のクロロホルム (関東化学社) を加え、攪拌後 3 分静置した。12000xg で 4℃にて 15 分の遠心分離を行った。上清を回収し、0.5ml の 2-イソプロパノール (関東化学社) を加え、10 分静置した。12000xg で 4℃にて 10 分の遠心分離を行った。上清を除いた後、70%エタノールを 1ml 加えた。7500xg で 4℃にて 5 分の遠心分離を行った。風乾後、50 μ l 水に溶解した。

抽出した全 RNA は、DNase 処理キット (RNasey Mini kit、RNase-Free DNase Set ; 共にキアゲン社)を用い、カラム上で DNase 処理を行った。キット添付のプロトコールに従って処理を行った。詳細を以下に記載する。全 RNA 溶液に水を加え、100 μ l とした。次に、350ml のキットに含まれるバッファーRLT を加え攪拌した。次に 250 μ l のエタノールを加え攪拌後、キットに含まれるカラム (RNeasy mini spin column) に加えた。8000xg にて 15 秒遠心した。350 μ l のキットに含まれるバッファーRW1 を加え、8000xg にて 15 秒遠心した。さらに、10 μ l の DNaseI ストック溶液および 70 μ l のキットに含まれるバッファーRDD を加え、室温で 15 分静置した。350 μ l のバッファーRW1 を加え、8000xg にて 15 秒遠心した。350 μ l のバッファー RW1 を加え、8000xg にて 15 秒遠心した。500 μ l のキットに含まれるバッファーRPE を加え、8000xg にて 15 秒遠心した。

500 μ l のバッファー-RPE を加え、15000xg にて 1 分遠心した。30 μ l 水を加え、8000xg にて 1 分遠心し、全 RNA 溶液を得た。

全 RNA を鋳型とした逆転写反応により、cDNA を作成した。全 RNA (1 μ g) を 10 μ l のランダムヘキサマー (100ng/ μ l) (アマシャムファルマシアバイオテク社) と混合し、最終量が 48 μ l となるように水を加えた。70°C で 10 分処理後、氷上に置いた。次に 32 μ l の RT 反応混合液を加えた。混合液の組成を以下に示す。5 xFirst-Strand Buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 10mM DTT, 0.5mM dNTP, Superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase (800 units) (以上全て GIBCO BRL 社)。混合後、25°C 15 分、42°C 50 分、70°C 15 分の処理を行った。

作成した cDNA を鋳型として、以下の実験を進めた。目的遺伝子の各測定サンプル間での相対的発現量を算出するための標準曲線を作成する鋳型として、human genomic DNA (クロンテック社) の希釈系列、あるいは各測定サンプルの混合液の希釈系列を用いた。また、サンプル中の cDNA 濃度の差を補正するため、補正用内部標準として G3PDH 遺伝子について同様の定量解析を行い、G3PDH 遺伝子の発現量を基に補正して、目的遺伝子の発現量を算出した。G3PDH により補正した各遺伝子の発現量のうち、OA 滑膜組織 G7 サンプルあるいは OA 滑膜線維芽様 OA1 サンプルの各遺伝子の発現量を 100 として、各サンプル、各遺伝子の相対的発現度を算出した。滑膜線維芽様細胞を用いた結果を図 2 及び表 3 に示した。RA 滑膜組織サンプル G1 は、OA 滑膜組織サンプル G7 に比して、RA2、RA3、RA4、DGPP1、及び DGPP2 の全ての遺伝子の発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、RA 滑膜組織のうち炎症程度の大きい G1 サンプルに比して、前記各遺伝子の発現量が有意に亢進しており、RA の病理所見スコアに連動して前記各遺伝子の発現量が亢進していること、すなわち RA の炎症症状が悪化するほど前記各遺伝子の発現量が亢進していることを見出した。RA 滑膜線維芽様サンプル RS1 は、OA 滑膜線維芽様サンプル OA1 及び OA2 に比して、RA2、RA3、RA4、DGPP1、及び DGPP2 の全ての遺伝子の発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、RA 滑膜線維芽様サンプルのうち RS1 サンプルは、RS2 サンプルに比して、前記各遺伝子の発現量が有意に亢進しており、RA の病理所見スコア

一に連動して前記各遺伝子の発現量が亢進していること、すなわち RA の炎症症状の重篤性と前記各遺伝子の発現量の亢進が相関することを見出した。

これらのことより、本実施例記載の方法で RA の進行度を検出することができ、RA 診断の検査が可能であることがわかった。

【表 3】

	DGPP1	DGPP2	RA2	RA3
RS1	273	762	4042	2076
RS2	246	221	1716	1136
OA1	100	100	100	100
OA2	86	123	66	99

産業上の利用可能性

本発明のポリヌクレオチドは、その発現亢進が RA 病態の程度と結びついていることから、RA 診断の指標となることが解かった。本発明のポリヌクレオチド、本発明の抗体、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは RA 診断の検査に有用である。本発明のポリペプチドは前記検査に有用な本発明の抗体を製造するために有用である。また、本発明は、RA 滑膜細胞で発現量が亢進する新規遺伝子を提供するものであり、その特異的なプライマー配列を用いた PCR により RA 診断の検査へ応用できる。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 13～24 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド。
2. 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
3. 請求の範囲 1 または請求の範囲 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
4. 請求の範囲 3 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
5. 請求の範囲 4 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。
6. 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1～10 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含みしかも慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、あるいは配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体。
7. 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、または配列番号 9 で表されるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基を有するポリヌクレオチド。
8. (1) 被験者の滑膜生検サンプルにおける、i) 請求の範囲 3 に記載の塩基配列あるいは ii) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号 12 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定

する工程、及び（２）健常者または非慢性関節リウマチ患者の滑膜生検サンプルにおける前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法。

9. （１）請求の範囲3に記載のポリヌクレオチド、あるいは（２）配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、配列番号１２で表されるアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、慢性関節リウマチ患者において発現が増強するポリペプチド、若しくは配列番号１２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで表される遺伝子の特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む慢性関節リウマチ検査用キット。

1/1

Fig. 1

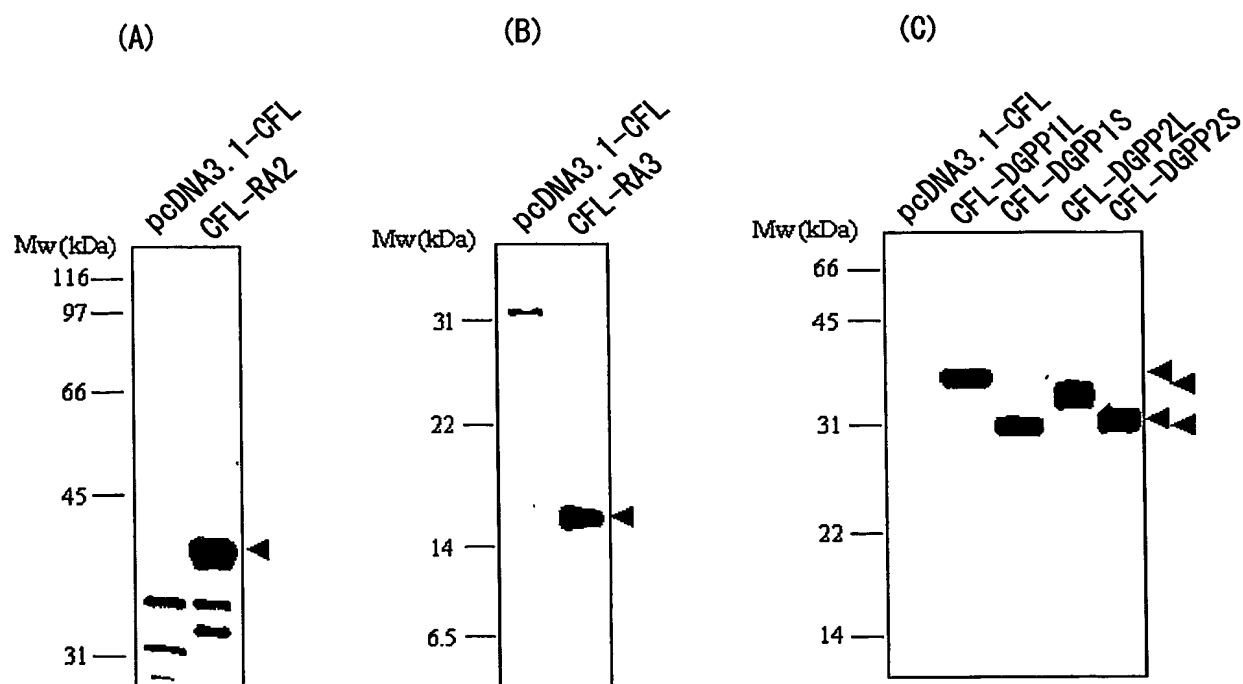
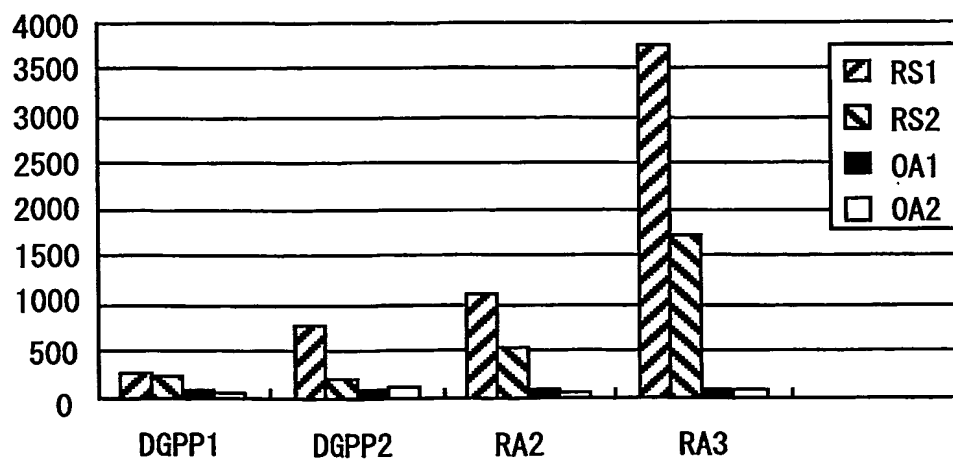


Fig. 2



1/34

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
Harigai, Masayoshi

<120> RA relating novel gene

<130> YHA0332-PCT

<150> JP2002-211951

<151> 2002-07-22

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1074

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

<223> Inventor: Takeuchi, Masahiro; Yamaji, Noboru; Takasaki, Jun;
Akamatsu, Masahiko; Tsunoyama, Kazuhisa; Harigai, Masayoshi

<400> 1

atg cag ctc agg aat gtg tca gag caa gaa ctg gac agc gtg gcc atg 48
Met Gln Leu Arg Asn Val Ser Glu Gln Glu Leu Asp Ser Val Ala Met
1 5 10 15

aag ctc ctt cac caa gta agc aag ctg tgt ggg aag tgc agc ccc act 96
Lys Leu Leu His Gln Val Ser Lys Leu Cys Gly Lys Cys Ser Pro Thr
20 25 30

2/34

gac gtg gac atc ctg cag ccc tcc ttc aac ttc ctg tat tgg agc ctt	144
Asp Val Asp Ile Leu Gln Pro Ser Phe Asn Phe Leu Tyr Trp Ser Leu	
35 40 45	
cat cag acc aca ccc agc agt cag aaa aga gct gct gca gtg ctc ctg	192
His Gln Thr Thr Pro Ser Ser Gln Lys Arg Ala Ala Ala Val Leu Leu	
50 55 60	
agc agc aca ggc ctg atg gag ctt ctg gag aag atg ctg gcc ctc acc	240
Ser Ser Thr Gly Leu Met Glu Leu Leu Glu Lys Met Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ttg gca aag gca gat tct ccc agg act gca ctc ctc tgc tct gcc tgg	288
Leu Ala Lys Ala Asp Ser Pro Arg Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala Trp	
85 90 95	
ctg ctc act gcc tcc ttc tct gcc cag cag cac aag ggc agt ttg cag	336
Leu Leu Thr Ala Ser Phe Ser Ala Gln Gln His Lys Gly Ser Leu Gln	
100 105 110	
gtt cac cag aca ctc tct gtg gaa atg gac caa gta ttg aag gct ctc	384
Val His Gln Thr Leu Ser Val Glu Met Asp Gln Val Leu Lys Ala Leu	
115 120 125	
agc ttt cca aag aaa aag gct gca cta ctc tca gct gcc atc tta tgc	432
Ser Phe Pro Lys Lys Lys Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Ile Leu Cys	
130 135 140	
ttc ctg cgg aca gcc ctg cga caa agc ttt tcc tct gcc ctg gta gcc	480
Phe Leu Arg Thr Ala Leu Arg Gln Ser Phe Ser Ser Ala Leu Val Ala	
145 150 155 160	
ctg gtg ccc tca ggg gcc cag cca ctg cca gcc acc aag gac act gtc	528
Leu Val Pro Ser Gly Ala Gln Pro Leu Pro Ala Thr Lys Asp Thr Val	
165 170 175	

3/34

cta gct cca ctg cga atg tcg caa gtc cgg tcc ctg gtc att ggg ctg Leu Ala Pro Leu Arg Met Ser Gln Val Arg Ser Leu Val Ile Gly Leu 180 185 190	576
cag aac ctc ctg gtg cag aag gac cct cta ttg tcc cag gcc tgt gtt Gln Asn Leu Leu Val Gln Lys Asp Pro Leu Leu Ser Gln Ala Cys Val 195 200 205	624
ggc tgc ctg gag gcc ttg ctt gac tac ctg gat gcc cgg agc cca gac Gly Cys Leu Glu Ala Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Ala Arg Ser Pro Asp 210 215 220	672
att gct ctc cac gtg gcc tcc cag cct tgg aat cgg ttt ttg ctg ttt Ile Ala Leu His Val Ala Ser Gln Pro Trp Asn Arg Phe Leu Leu Phe 225 230 235 240	720
acc ctc ttg gat gct gga gag aat tcc ttc ctc aga cct gag att ttg Thr Leu Leu Asp Ala Gly Glu Asn Ser Phe Leu Arg Pro Glu Ile Leu 245 250 255	768
agg ctc atg acc ctg ttt atg cgg tac cgg agt agc agt gtc ctc tct Arg Leu Met Thr Leu Phe Met Arg Tyr Arg Ser Ser Ser Val Leu Ser 260 265 270	816
cat gaa gag gtg ggt gat gtt ctg caa ggt gtg gct ttg gct gac ctg His Glu Glu Val Gly Asp Val Leu Gln Gly Val Ala Leu Ala Asp Leu 275 280 285	864
tct acc ctc tcg aac acc aca ctc cag gcc ctg cat ggc ttc ttc cag Ser Thr Leu Ser Asn Thr Thr Leu Gln Ala Leu His Gly Phe Phe Gln 290 295 300	912
cag ctc cag agc atg gga cac ctg gct gac cac agc atg gcc cag acc Gln Leu Gln Ser Met Gly His Leu Ala Asp His Ser Met Ala Gln Thr 305 310 315 320	960

4/34

ctg cag gcc tcc ttg gag ggc ctt ccc cct agc acc tcc tca ggc cag 1008
Leu Gln Ala Ser Leu Glu Gly Leu Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly Gln
325 330 335

cca ccc ctg cag gac atg ctc tgc ctg gga ggg gtg gct gta tcc ctg 1056
Pro Pro Leu Gln Asp Met Leu Cys Leu Gly Gly Val Ala Val Ser Leu
340 345 350

tcc cac atc aga aac tga 1074
Ser His Ile Arg Asn
355

<210> 2

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Leu Arg Asn Val Ser Glu Gln Glu Leu Asp Ser Val Ala Met
1 5 10 15

Lys Leu Leu His Gln Val Ser Lys Leu Cys Gly Lys Cys Ser Pro Thr
20 25 30

Asp Val Asp Ile Leu Gln Pro Ser Phe Asn Phe Leu Tyr Trp Ser Leu
35 40 45

His Gln Thr Thr Pro Ser Ser Gln Lys Arg Ala Ala Ala Val Leu Leu
50 55 60

5/34

Ser Ser Thr Gly Leu Met Glu Leu Leu Glu Lys Met Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ala Lys Ala Asp Ser Pro Arg Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala Trp
85 90 95

Leu Leu Thr Ala Ser Phe Ser Ala Gln Gln His Lys Gly Ser Leu Gln
100 105 110

Val His Gln Thr Leu Ser Val Glu Met Asp Gln Val Leu Lys Ala Leu
115 120 125

Ser Phe Pro Lys Lys Lys Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ala Ile Leu Cys
130 135 140

Phe Leu Arg Thr Ala Leu Arg Gln Ser Phe Ser Ser Ala Leu Val Ala
145 150 155 160

Leu Val Pro Ser Gly Ala Gln Pro Leu Pro Ala Thr Lys Asp Thr Val
165 170 175

Leu Ala Pro Leu Arg Met Ser Gln Val Arg Ser Leu Val Ile Gly Leu
180 185 190

Gln Asn Leu Leu Val Gln Lys Asp Pro Leu Leu Ser Gln Ala Cys Val
195 200 205

6/34

Gly Cys Leu Glu Ala Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Ala Arg Ser Pro Asp
210 215 220

Ile Ala Leu His Val Ala Ser Gln Pro Trp Asn Arg Phe Leu Leu Phe
225 230 235 240

Thr Leu Leu Asp Ala Gly Glu Asn Ser Phe Leu Arg Pro Glu Ile Leu
245 250 255

Arg Leu Met Thr Leu Phe Met Arg Tyr Arg Ser Ser Ser Val Leu Ser
260 265 270

His Glu Glu Val Gly Asp Val Leu Gln Gly Val Ala Leu Ala Asp Leu
275 280 285

Ser Thr Leu Ser Asn Thr Thr Leu Gln Ala Leu His Gly Phe Phe Gln
290 295 300

Gln Leu Gln Ser Met Gly His Leu Ala Asp His Ser Met Ala Gln Thr
305 310 315 320

Leu Gln Ala Ser Leu Glu Gly Leu Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly Gln
325 330 335

Pro Pro Leu Gln Asp Met Leu Cys Leu Gly Gly Val Ala Val Ser Leu
340 345 350

7/34

Ser His Ile Arg Asn
355

<210> 3
<211> 306
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (303)
<223>

<400> 3
atg cct aga agg gga cca caa cag act cga cag gat cca ccg gtt ggg 48
Met Pro Arg Arg Gly Pro Gln Gln Thr Arg Gln Asp Pro Pro Val Gly
1 5 10 15

ccc aag gca gga gga agg gcg gcg ccc cca aac tcc cag gac gcc tgc 96
Pro Lys Ala Gly Gly Arg Ala Ala Pro Pro Asn Ser Gln Asp Ala Cys
20 25 30

agc acc ccc cac gcg ccg ctc tcc gcc tct ggg gag cat cct gcc acc 144
Ser Thr Pro His Ala Pro Leu Ser Ala Ser Gly Glu His Pro Ala Thr
35 40 45

ccc cga cac aca cac ccc ggc tac atc ccg cct tot cac gct tgg tca 192
Pro Arg His Thr His Pro Gly Tyr Ile Pro Pro Ser His Ala Trp Ser
50 55 60

ggc gct ctg gag atg tcg gag atc cag gct ttt cct aaa gag tca gga 240
Gly Ala Leu Glu Met Ser Glu Ile Gln Ala Phe Pro Lys Glu Ser Gly
65 70 75 80

8/34

ttg gaa ggc gga ctc cca ccg ttt gct gag ctc cac atg aca aca gca 288
Leu Glu Gly Gly Leu Pro Pro Phe Ala Glu Leu His Met Thr Thr Ala
85 90 95

gac gac agg ccg cac tga 306
Asp Asp Arg Pro His
100

<210>	4
<211>	101
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Arg Arg Gly Pro Gln Gln Thr Arg Gln Asp Pro Pro Val Gly
1 5 10 15

Pro Lys Ala Gly Gly Arg Ala Ala Pro Pro Asn Ser Gln Asp Ala Cys
20 25 30

Ser Thr Pro His Ala Pro Leu Ser Ala Ser Gly Glu His Pro Ala Thr
35 40 45

Pro Arg His Thr His Pro Gly Tyr Ile Pro Pro Ser His Ala Trp Ser
50 55 60

Gly Ala Leu Glu Met Ser Glu Ile Gln Ala Phe Pro Lys Glu Ser Gly
65 70 75 80

9/34

Leu Glu Gly Gly Leu Pro Pro Phe Ala Glu Leu His Met Thr Thr Ala
 85 90 95

Asp Asp Arg Pro His
 100

<210> 5
 <211> 942
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (939)
 <223>

<400> 5
 atg ccc tcg gca cag ccg cca ggc cgt ctt cct ggg gag ccg ccg gag 48
 Met Pro Ser Ala Gln Pro Pro Gly Arg Leu Pro Gly Glu Pro Pro Glu
 1 5 10 15

cgc ggg caa ctg gga gag ggg gcg gtg ccc agt tcc cgg ccc ggc cct 96
 Arg Gly Gln Leu Gly Glu Gly Ala Val Pro Ser Ser Arg Pro Gly Pro
 20 25 30

ccc cgc gga ggt ggc cac gtc agc gca gcg tcg ctc gga gct cgc ggc 144
 Pro Arg Gly Gly Gly His Val Ser Ala Ala Ser Leu Gly Ala Arg Gly
 35 40 45

cgg atg ggg aag gcg gcg gcg gcg gtg gcc ttt ggg gcc gaa gtg ggc 192
 Arg Met Gly Lys Ala Ala Ala Ala Val Ala Phe Gly Ala Glu Val Gly
 50 55 60

gtg cgg ctc gcg ctg ttc gcg gcc ttc ctg gtg acg gag ctg ctc ccc 240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

ctg gcc ttt gcg tcc ttc tac ctg gca ggg aag tta cac tgc ttc aca

11/34

Leu Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr
 210 215 220

cca caa ggc cgt ggg aaa tct tgg agg ttc tgt gcc ttt ctg tca cct 720
 Pro Gln Gly Arg Gly Lys Ser Trp Arg Phe Cys Ala Phe Leu Ser Pro
 225 230 235 240

cta ctt ttt gca gct gtg att gca ctg tcc cgc aca tgt gac tac aag 768
 Leu Leu Phe Ala Ala Val Ile Ala Leu Ser Arg Thr Cys Asp Tyr Lys
 245 250 255

cat cac tgg caa gat gta cta gtt gga tcc atg att gga atg aca ttt 816
 His His Trp Gln Asp Val Leu Val Gly Ser Met Ile Gly Met Thr Phe
 260 265 270

gcc tat gtc tgc tat cgg cag tat tat cct cct ctg act gat gca gaa 864
 Ala Tyr Val Cys Tyr Arg Gln Tyr Tyr Pro Pro Leu Thr Asp Ala Glu
 275 280 285

tgc cat aaa cca ttt caa gac aaa ctt gta ctt tcc act gca cag aag 912
 Cys His Lys Pro Phe Gln Asp Lys Leu Val Leu Ser Thr Ala Gln Lys
 290 295 300

cct ggg gat tct tat tgt ttt gat att taa 942
 Pro Gly Asp Ser Tyr Cys Phe Asp Ile
 305 310

<210> 6

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Ser Ala Gln Pro Pro Gly Arg Leu Pro Gly Glu Pro Pro Glu

12/34

1 5 10 15

Arg Gly Gln Leu Gly Glu Gly Ala Val Pro Ser Ser Arg Pro Gly Pro
20 25 30

Pro Arg Gly Gly Gly His Val Ser Ala Ala Ser Leu Gly Ala Arg Gly
35 40 45

Arg Met Gly Lys Ala Ala Ala Ala Val Ala Phe Gly Ala Glu Val Gly
50 55 60

Val Arg Leu Ala Leu Phe Ala Ala Phe Leu Val Thr Glu Leu Leu Pro
65 70 75 80

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Gln Pro Glu Glu Met Trp Leu Tyr Arg Asn
85 90 95

Pro Tyr Val Glu Ala Glu Tyr Phe Pro Thr Lys Pro Met Phe Val Ile
100 105 110

Ala Phe Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Lys Phe Leu Lys
115 120 125

Lys Ala Asp Thr Arg Asp Ser Arg Gln Ala Cys Leu Ala Ala Ser Leu
130 135 140

Ala Leu Ala Leu Asn Gly Val Phe Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val

13/34

145

150

155

160

Gly Arg Pro Arg Pro Asp Phe Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Leu
165 170 175

Ala His Ser Asp Leu Met Cys Thr Gly Asp Lys Asp Val Val Asn Glu
180 185 190

Gly Arg Lys Ser Phe Pro Ser Gly His Ser Ser Phe Ala Phe Ala Gly
195 200 205

Leu Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr
210 215 220

Pro Gln Gly Arg Gly Lys Ser Trp Arg Phe Cys Ala Phe Leu Ser Pro
225 230 235 240

Leu Leu Phe Ala Ala Val Ile Ala Leu Ser Arg Thr Cys Asp Tyr Lys
245 250 255

His His Trp Gln Asp Val Leu Val Gly Ser Met Ile Gly Met Thr Phe
260 265 270

Ala Tyr Val Cys Tyr Arg Gln Tyr Tyr Pro Pro Leu Thr Asp Ala Glu
275 280 285

Cys His Lys Pro Phe Gln Asp Lys Leu Val Leu Ser Thr Ala Gln Lys

14/34

300

Pro Gly Asp Ser Tyr Cys Phe Asp Ile
305 310

$\langle 210 \rangle$	7
$\langle 211 \rangle$	795
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(792)
<223>

<400> 7
atg ggg aag gcg gcg gcg gcg gtg gcc ttt ggg gcc gaa gtg ggc gtg 48
Met Gly Lys Ala Ala Ala Ala Val Ala Phe Gly Ala Glu Val Gly Val
1 5 10 15

cgg ctc gcg ctg ttc gcg gcc ttc ctg gtg acg gag ctg ctc ccc ccg 96
Arg Leu Ala Leu Phe Ala Ala Phe Leu Val Thr Glu Leu Leu Pro Pro
20 25 30

ttc cag aga ctc atc cag ccg gag gag atg tgg ctc tac cgg aac ccc 144
Phe Gln Arg Leu Ile Gln Pro Glu Glu Met Trp Leu Tyr Arg Asn Pro
35 40 45

tac gtg gag gcg gag tat ttc ccc acc aag ccg atg ttt gtt att gca 192
 Tyr Val Glu Ala Glu Tyr Phe Pro Thr Lys Pro Met Phe Val Ile Ala
 50 55 60

ttt ctc tct cca ctg tct ctg atc ttc ctg gcc aaa ttt ctc aag aag 240
Phe Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Lys Phe Leu Lys Lys

15/34

65	70	75	80	
gca gac aca aga gac agc aga caa gcc tgc ctg gct gcc agc ctt gcc				288
Ala Asp Thr Arg Asp Ser Arg Gln Ala Cys Leu Ala Ala Ser Leu Ala				
	85	90	95	
ctg gct ctg aat ggc gtc ttt acc aac aca ata aaa ctg atc gta ggg				336
Leu Ala Leu Asn Gly Val Phe Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly				
	100	105	110	
agg cca cgc cca gat ttc ttc tac cgc tgc ttc cct gat ggg cta gcc				384
Arg Pro Arg Pro Asp Phe Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Leu Ala				
	115	120	125	
cat tct gac ttg atg tgt aca ggg gat aag gac gtg gtg aat gag ggc				432
His Ser Asp Leu Met Cys Thr Gly Asp Lys Asp Val Val Asn Glu Gly				
	130	135	140	
cga aag agc ttc ccc agt gga cat tct tcc ttt gca ttt gct ggt ctg				480
Arg Lys Ser Phe Pro Ser Gly His Ser Ser Phe Ala Phe Ala Gly Leu				
	145	150	155	160
gcc ttt gcg tcc ttc tac ctg gca ggg aag tta cac tgc ttc aca cca				528
Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Pro				
	165	170	175	
caa ggc cgt ggg aaa tct tgg agg ttc tgt gcc ttt ctg tca cct cta				576
Gln Gly Arg Gly Lys Ser Trp Arg Phe Cys Ala Phe Leu Ser Pro Leu				
	180	185	190	
ctt ttt gca gct gtg att gca ctg tcc cgc aca tgt gac tac aag cat				624
Leu Phe Ala Ala Val Ile Ala Leu Ser Arg Thr Cys Asp Tyr Lys His				
	195	200	205	
cac tgg caa gat gta cta gtt gga tcc atg att gga atg aca ttt gcc				672
His Trp Gln Asp Val Leu Val Gly Ser Met Ile Gly Met Thr Phe Ala				

16/34

210

215

220

tat gtc tgc tat cgg cag tat tat cct cct ctg act gat gca gaa tgc 720
Tyr Val Cys Tyr Arg Gln Tyr Tyr Pro Pro Leu Thr Asp Ala Glu Cys
225 230 235 240

cat aaa cca ttt caa gac aaa ctt gta ctt tcc act gca cag aag cct 768
His Lys Pro Phe Gln Asp Lys Leu Val Leu Ser Thr Ala Gln Lys Pro
245 250 255

ggg gat tct tat tgt ttt gat att taa 795
Gly Asp Ser Tyr Cys Phe Asp Ile
260

<210> 8

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Lys Ala Ala Ala Ala Val Ala Phe Gly Ala Glu Val Gly Val
1 5 10 15

Arg Leu Ala Leu Phe Ala Ala Phe Leu Val Thr Glu Leu Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Gln Arg Leu Ile Gln Pro Glu Glu Met Trp Leu Tyr Arg Asn Pro
35 40 45

Tyr Val Glu Ala Glu Tyr Phe Pro Thr Lys Pro Met Phe Val Ile Ala
50 55 60

17/34

Phe Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Lys Phe Leu Lys Lys
65 70 75 80

Ala Asp Thr Arg Asp Ser Arg Gln Ala Cys Leu Ala Ala Ser Leu Ala
85 90 95

Leu Ala Leu Asn Gly Val Phe Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly
100 105 110

Arg Pro Arg Pro Asp Phe Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Leu Ala
115 120 125

His Ser Asp Leu Met Cys Thr Gly Asp Lys Asp Val Val Asn Glu Gly
130 135 140

Arg Lys Ser Phe Pro Ser Gly His Ser Ser Phe Ala Phe Ala Gly Leu
145 150 155 160

Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Pro
165 170 175

Gln Gly Arg Gly Lys Ser Trp Arg Phe Cys Ala Phe Leu Ser Pro Leu
180 185 190

Leu Phe Ala Ala Val Ile Ala Leu Ser Arg Thr Cys Asp Tyr Lys His
195 200 205

18/34

His Trp Gln Asp Val Leu Val Gly Ser Met Ile Gly Met Thr Phe Ala
 210 215 220

Tyr Val Cys Tyr Arg Gln Tyr Tyr Pro Pro Leu Thr Asp Ala Glu Cys
 225 230 235 240

His Lys Pro Phe Gln Asp Lys Leu Val Leu Ser Thr Ala Gln Lys Pro
 245 250 255

Gly Asp Ser Tyr Cys Phe Asp Ile
 260

<210> 9
 <211> 876
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (873)
 <223>

<400> 9
 atg gct gcg gga gcc gcg gag agc acc agc tgt cgc cgc ggg agc tgc 48
 Met Ala Ala Gly Ala Ala Glu Ser Thr Ser Cys Arg Arg Gly Ser Cys
 1 5 10 15

tcc ggc cgc acc atg cgg gag ctg gcc att gag atc ggg gtg cga gcc 96
 Ser Gly Arg Thr Met Arg Glu Leu Ala Ile Glu Ile Gly Val Arg Ala
 20 25 30

19/34

ctg ctc ttc gga gtc ttc gtt ttt aca gag ttt ttg gat cgc ttc cag	144
Leu Leu Phe Gly Val Phe Val Phe Thr Glu Phe Leu Asp Pro Phe Gln	
35 40 45	
aga gtc atc cag cca gaa gag atc tgg ctc tat aaa aat cct ttg gtg	192
Arg Val Ile Gln Pro Glu Glu Ile Trp Leu Tyr Lys Asn Pro Leu Val	
50 55 60	
caa tca gat aac ata cct acc cgc ctc atg ttt gca att tct ttc ctc	240
Gln Ser Asp Asn Ile Pro Thr Arg Leu Met Phe Ala Ile Ser Phe Leu	
65 70 75 80	
aca ccc ctg gct gtt att tgt gtg gtg aaa att atc cgg cga aca gac	288
Thr Pro Leu Ala Val Ile Cys Val Val Lys Ile Ile Arg Arg Thr Asp	
85 90 95	
aag act gaa att aag gaa gcc ttc tta gcg gtg tcc ttg gct ctt gct	336
Lys Thr Glu Ile Lys Glu Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Ala Leu Ala	
100 105 110	
ttg aat gga gtc tgc aca aac act att aaa tta ata gtg gga aga cct	384
Leu Asn Gly Val Cys Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly Arg Pro	
115 120 125	
cgc ccc gat ttc ttt tac cgc tgc ttt cca gat gga gtg atg aac tcg	432
Arg Pro Asp Phe Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Val Met Asn Ser	
130 135 140	
gaa atg cat tgc aca ggt gac ccc gat ctg gtg tcc gag ggc cgc aaa	480
Glu Met His Cys Thr Gly Asp Pro Asp Leu Val Ser Glu Gly Arg Lys	
145 150 155 160	
agc ttc ccc agc atc cat tcc tcc ttt gcc ttt tcg ggc ctt ggc ttc	528
Ser Phe Pro Ser Ile His Ser Ser Phe Ala Phe Ser Gly Leu Gly Phe	
165 170 175	

20/34

acg acg ttc tac ttg gcg ggc aag ctg cac tgc ttc acc gag agt ggg	576
Thr Thr Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Glu Ser Gly	
180 185 190	
cgg gga aag agc tgg cgg ctc tgt gct gcc atc ctg ccc ttg tac tgc	624
Arg Gly Lys Ser Trp Arg Leu Cys Ala Ala Ile Leu Pro Leu Tyr Cys	
195 200 205	
gcc atg atg att gcc ctg tcc cgc atg tgc gac tac aag cat cac tgg	672
Ala Met Met Ile Ala Leu Ser Arg Met Cys Asp Tyr Lys His His Trp	
210 215 220	
caa gat tcc ttt gtg ggt gga gtc atc ggc ctc att ttt gca tac att	720
Gln Asp Ser Phe Val Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Phe Ala Tyr Ile	
225 230 235 240	
tgc tac aga cag cac tat cct cct ctg gcc aac aca gct tgc cat aaa	768
Cys Tyr Arg Gln His Tyr Pro Pro Leu Ala Asn Thr Ala Cys His Lys	
245 250 255	
ccc tac gtt agt ctg cga gtc cca gcc tca ctg aag aaa gag gag agg	816
Pro Tyr Val Ser Leu Arg Val Pro Ala Ser Leu Lys Lys Glu Glu Arg	
260 265 270	
ccc aca gct gac agc gca ccc agc ttg cct ctg gag ggg atc acc gaa	864
Pro Thr Ala Asp Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Gly Ile Thr Glu	
275 280 285	
ggc ccg gta tga	876
Gly Pro Val	
290	

<210> 10

<211> 291

21/34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Ala Gly Ala Ala Glu Ser Thr Ser Cys Arg Arg Gly Ser Cys
1 5 10 15

Ser Gly Arg Thr Met Arg Glu Leu Ala Ile Glu Ile Gly Val Arg Ala
20 25 30

Leu Leu Phe Gly Val Phe Val Phe Thr Glu Phe Leu Asp Pro Phe Gln
35 40 45

Arg Val Ile Gln Pro Glu Glu Ile Trp Leu Tyr Lys Asn Pro Leu Val
50 55 60

Gln Ser Asp Asn Ile Pro Thr Arg Leu Met Phe Ala Ile Ser Phe Leu
65 70 75 80

Thr Pro Leu Ala Val Ile Cys Val Val Lys Ile Ile Arg Arg Thr Asp
85 90 95

Lys Thr Glu Ile Lys Glu Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Ala Leu Ala
100 105 110

Leu Asn Gly Val Cys Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly Arg Pro
115 120 125

22/34

Arg Pro Asp Phe Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Val Met Asn Ser
130 135 140

Glu Met His Cys Thr Gly Asp Pro Asp Leu Val Ser Glu Gly Arg Lys
145 150 155 160

Ser Phe Pro Ser Ile His Ser Ser Phe Ala Phe Ser Gly Leu Gly Phe
165 170 175

Thr Thr Phe Tyr Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Glu Ser Gly
180 185 190

Arg Gly Lys Ser Trp Arg Leu Cys Ala Ala Ile Leu Pro Leu Tyr Cys
195 200 205

Ala Met Met Ile Ala Leu Ser Arg Met Cys Asp Tyr Lys His His Trp
210 215 220

Gln Asp Ser Phe Val Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Phe Ala Tyr Ile
225 230 235 240

Cys Tyr Arg Gln His Tyr Pro Pro Leu Ala Asn Thr Ala Cys His Lys
245 250 255

Pro Tyr Val Ser Leu Arg Val Pro Ala Ser Leu Lys Lys Glu Glu Arg
260 265 270

23/34

Pro Thr Ala Asp Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Gly Ile Thr Glu
 275 280 285

Gly Pro Val
 290

<210> 11
 <211> 816
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (813)
 <223>

<400> 11
 atg cgg gag ctg gcc att gag atc ggg gtg cga gcc ctg ctc ttc gga 48
 Met Arg Glu Leu Ala Ile Glu Ile Gly Val Arg Ala Leu Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 gtc ttc gtt ttt aca gag ttt ttg gat cgg ttc cag aga gtc atc cag 96
 Val Phe Val Phe Thr Glu Phe Leu Asp Pro Phe Gln Arg Val Ile Gln
 20 25 30
 cca gaa gag atc tgg ctc tat aaa aat cct ttg gtg caa tca gat aac 144
 Pro Glu Glu Ile Trp Leu Tyr Lys Asn Pro Leu Val Gln Ser Asp Asn
 35 40 45
 ata cct acc cgc ctc atg ttt gca att tct ttc ctc aca ccc ctg gct 192
 Ile Pro Thr Arg Leu Met Phe Ala Ile Ser Phe Leu Thr Pro Leu Ala
 50 55 60

24/34

gtt att tgt gtg gtg aaa att atc cgg cga aca gac aag act gaa att 240
Val Ile Cys Val Val Lys Ile Ile Arg Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ile
65 70 75 80

aag gaa gcc ttc tta gcg gtg tcc ttg gct ctt gct ttg aat gga gtc 288
Lys Glu Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Ala Leu Ala Leu Asn Gly Val
85 90 95

tgc aca aac act att aaa tta ata gtg gga aga cct cgc ccc gat ttc 336
Cys Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly Arg Pro Arg Pro Asp Phe
100 105 110

ttt tac cgc tgc ttt cca gat gga gtg atg aac tcg gaa atg cat tgc 384
 Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Val Met Asn Ser Glu Met His Cys
 115 120 125

aca ggt gac ccc gat ctg gtg tcc gag ggc cgc aaa agc ttc ccc agc 432
Thr Gly Asp Pro Asp Leu Val Ser Glu Gly Arg Lys Ser Phe Pro Ser
130 135 140

atc cat tcc tcc ttt gcc ttt tog ggc ctt ggc ttc acg acg ttc tac 480
Ile His Ser Ser Phe Ala Phe Ser Gly Leu Gly Phe Thr Thr Phe Tyr
145 150 155 160

ttg gcg ggc aag ctg cac tgc ttc acc gag agt ggg cgg gga aag agc 528
Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Glu Ser Gly Arg Gly Lys Ser
165 170 175

tgg cgg ctc tgt gct gcc atc ctg ccc ttg tac tgc gcc atg atg att 576
Trp Arg Leu Cys Ala Ala Ile Leu Pro Leu Tyr Cys Ala Met Met Ile
180 185 190

gcc ctg tcc cgc atg tgc gac tac aag cat cac tgg caa gat tcc ttt 624
Ala Leu Ser Arg Met Cys Asp Tyr Lys His His Trp Gln Asp Ser Phe
195 200 205

25/34

gtg ggt gga gtc atc ggc ctc att ttt gca tac att tgc tac aga cag 672
Val Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Phe Ala Tyr Ile Cys Tyr Arg Gln
210 215 220

cac tat cct cct ctg gcc aac aca gct tgc cat aaa ccc tac gtt agt 720
His Tyr Pro Pro Leu Ala Asn Thr Ala Cys His Lys Pro Tyr Val Ser
225 230 235 240

ctg cga gtc cca gcc tca ctg aag aaa gag gag agg ccc aca gct gac 768
Leu Arg Val Pro Ala Ser Leu Lys Lys Glu Glu Arg Pro Thr Ala Asp
245 250 255

agc gca ccc agc ttg cct ctg gag ggg atc acc gaa ggc ccg gta tga 816
Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Gly Ile Thr Glu Gly Pro Val
260 265 270

<210> 12

<211> 271

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Glu Leu Ala Ile Glu Ile Gly Val Arg Ala Leu Leu Phe Gly
1 5 10 15

Val Phe Val Phe Thr Glu Phe Leu Asp Pro Phe Gln Arg Val Ile Gln
20 25 30

Pro Glu Glu Ile Trp Leu Tyr Lys Asn Pro Leu Val Gln Ser Asp Asn
35 40 45

26/34

Ile Pro Thr Arg Leu Met Phe Ala Ile Ser Phe Leu Thr Pro Leu Ala
50 55 60

Val Ile Cys Val Val Lys Ile Ile Arg Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ile
65 70 75 80

Lys Glu Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Ala Leu Ala Leu Asn Gly Val
85 90 95

Cys Thr Asn Thr Ile Lys Leu Ile Val Gly Arg Pro Arg Pro Asp Phe
100 105 110

Phe Tyr Arg Cys Phe Pro Asp Gly Val Met Asn Ser Glu Met His Cys
115 120 125

Thr Gly Asp Pro Asp Leu Val Ser Glu Gly Arg Lys Ser Phe Pro Ser
130 135 140

Ile His Ser Ser Phe Ala Phe Ser Gly Leu Gly Phe Thr Thr Phe Tyr
145 150 155 160

Leu Ala Gly Lys Leu His Cys Phe Thr Glu Ser Gly Arg Gly Lys Ser
165 170 175

Trp Arg Leu Cys Ala Ala Ile Leu Pro Leu Tyr Cys Ala Met Met Ile
180 185 190

27/34

Ala Leu Ser Arg Met Cys Asp Tyr Lys His His Trp Gln Asp Ser Phe
195 200 205

Val Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Phe Ala Tyr Ile Cys Tyr Arg Gln
210 215 220

His Tyr Pro Pro Leu Ala Asn Thr Ala Cys His Lys Pro Tyr Val Ser
225 230 235 240

Leu Arg Val Pro Ala Ser Leu Lys Lys Glu Glu Arg Pro Thr Ala Asp
245 250 255

Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Gly Ile Thr Glu Gly Pro Val
260 265 270

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

cgcgcgatc cgccaccatg cagctcagga atgtgtc

37

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

28/34

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

gcgcgctcga ggtttctgat gtgggacagg g

31

<210> 15

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gcgcggaagct tgccaccatg cctagaaggg gaccaca

37

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

gcgcgctcga ggtgcggcct gtcgtctgct

30

29/34

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

gcgcgaagct tgccaccatg ccctcggcac agccg

35

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gcgcgctcga gaatatcaaa acaataagaa tcccc

35

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

30/34

gcgcgaagct tgccaccatg gggaaggcgg cggcg

35

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

gcgcgaagct tgccaccatg gctgcgggag ccgcg

35

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

gcgcgctcga gtaccgggcc ttcggtgac

30

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

31/34

synthesized primer sequence

<400> 22

gcgcgaagct tgccaccatg cgggagctgg ccattg

36

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

tcgaggacta caaggacgac gatgacaagc t

31

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

ctagagcttg tcatcgctgt ccttgtagtc c

31

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

32/34

<400> 25

cacgtggcct cccagc

16

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

taggttctcc catttgtgt tttt

24

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cccttgaaca acgcaggctc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

tttgtaggga caccacactg

20

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

33/34

<400> 29
ottccaaggt gcaagtgagg a 21

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 30
cattggaggc agaatacagt gtg 23

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
tcctgggagg atggacacta 20

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
tgatgtcagg gtggcagatg t 21

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

34/34

<400> 33

gggaaggtga aggtogga

18

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gcagccctgg tgaccag

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C07K16/18, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C07K16/18, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/
GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/32910 A1 (Human Genome Sciences, Inc.), 10 May, 2001 (10.05.01), Claims 18 to 19; Sequence No. 111 & EP 1224285 A2 & AU 200114380 A	1-5, 7-9
X	WO 00/42070 A1 (Zymogenetics, Inc.), 20 July, 2000 (20.07.00), Sequence No. 4 & EP 1144450 A1 & JP 2002-534964 A & AU 2000227282 A	1-5, 7-9
X A	WO 01/55301 A2 (Human Genome Sciences, Inc.), 02 August, 2001 (02.08.01), Sequence No. 1512, [462] & AU 200152878 A	1-5, 7-9 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 September, 2003 (02.09.03)	Date of mailing of the international search report 16 September, 2003 (16.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/77137 A1 (Human Genome Science, Inc.), 18 October, 2001 (18.10.01), Sequence No. 277 & EP 1276756 A1 & AU 200166557 A	1-5, 7-9
A	WO 02/26798 A1 (Shanghai Biowindow Gene Dev. Inc.), 04 April, 2002 (04.04.02), Page 29 & CN 1339599 A & AU 200221427 A	1-5, 7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09180

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-9 are directed to inventions relating to a polypeptide having an amino acid sequence specified in any of the sequence numbers 2, 4, 6, 8, 10 and 12 or a method of using the polypeptide. However, the polypeptides having the above amino acid sequences cannot be recognized as having a common structure, and the polypeptide which is incident in the synovial tissue of rheumatoid arthritis is not novel. Therefore, the inventions claimed in claims 1-9 are to be classified into six invention groups relating to polypeptides each having an amino acid sequence specified in any of the sequence numbers 2, 4, 6, 8, 10 and 12, and these invention groups cannot be recognized as constituting a group of inventions linked so as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 5/10, C07K 16/18, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 5/10, C07K 16/18, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/32910 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2001.05.10, 請求項 18 及び 19、配列番号 111 参照 & EP 1224285 A2 & AU 200114380 A	1-5, 7-9
X	WO 00/42070 A1 (Zymogenetics, Inc.) 2000.07.20, 配列番号 4 参照 & EP 1144450 A1 & JP 2002-534964 A & AU 200027282 A	1-5, 7-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.09.03

国際調査報告の発送日

16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 01/55301 A2 (Human Genome Sciences, Inc.) 2001.08.02 配列番号 1 5 1 2 及び [4 6 2] 参照 & AU 200152878 A	1-5, 7-9 6
A	WO 01/77137 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2001.10.18 配列番号 2 7 7 参照 & EP 1276756 A1 & AU 200166557 A	1-5, 7-9
A	WO 02/26798 A1 (Shanghai Biowindow Gene Dev. Inc.) 2002.04.04 第 2 9 頁参照 & CN 1339599 A & AU 200221427 A	1-5, 7-9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-9に記載された発明は、配列番号2、4、6、8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は該ポリペプチドを利用した方法に係る発明であるが、これらのアミノ酸配列からなるポリペプチドは、共通な構造を有するとはいえず、また、慢性関節リウマチの滑膜組織において発現しているポリペプチドは、新規であるとは認められないので、請求の範囲1-9に記載された発明は、配列番号2、4、6、8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに関連する6つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。